

特許協力条約

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

BEC'D 22 DEC 2005

PCT

(法第 12 条、法施行規則第 56 条)
[PCT 36 条及び PCT 規則 70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-015	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP2004/013812	国際出願日 (日.月.年) 22.09.2004	優先日 (日.月.年) 26.09.2003	
国際特許分類(IPC) Int.Cl. C12N1/20, A23L1/105, A23L1/20, A61K35/74, A61K35/80, A61K35/78, A61P37/04			
出願人(氏名又は名称) 杣 源一郎			

国際予備審査の請求書を受理した日 01.04.2005	国際予備審査報告を作成した日 06.12.2005
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高 美葉子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9839

第I欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- 出願時の言語による国際出願
 出願時の言語から次の目的ための言語である _____ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
 国際調査 (PCT規則12.3(a)及び23.1(b))
 国際公開 (PCT規則12.4(a))
 国際予備審査 (PCT規則55.2(a)又は55.3(a))

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条 (PCT第14条) の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

- 出願時の国際出願書類

- 明細書

第 1 - 6, 8, 10 - 34 ページ、出願時に提出されたもの
 第 7, 9, 9 / 1 ページ*, 01. 04. 2005 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

- 請求の範囲

第 2 - 17 項、出願時に提出されたもの
 第 _____ 項*, PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 第 1, 18 - 29 項*, 01. 04. 2005 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ 項*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

- 図面

第 1 ページ/図、出願時に提出されたもの
 第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
 第 _____ ページ/図*, _____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

- 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 第 _____ ページ/図
 配列表 (具体的に記載すること)
 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則 70.2(c))

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 第 _____ ページ/図
 配列表 (具体的に記載すること)
 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、
それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 7, 10-17, 20-24, 26-29	有
	請求の範囲 1-6, 8, 9, 18, 19, 25	無
進歩性 (I S)	請求の範囲 10-17, 20-23, 26-29	有
	請求の範囲 1-9, 18, 19, 24, 25	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1-29	有
	請求の範囲 _____	無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1 : JP 06-078756 A (千葉製粉株式会社) 1994. 03. 22
 & EP 472467 A & US 5281583 A & JP 06-040937 A & JP 06-090745 A
 & US 5346891 A & US 5494819 A & JP 04-099481 A
- 文献2 : Hiroyuki INAGAWA, et. al., Anti-tumor effect of lipopolysaccharide by intradermal administration as a novel drug delivery system., Anticancer Research (1997), Vol. 17, No. 3C, p. 2153-2158
- 文献3 : 稲川裕之, 桧原一郎, 他, Pantoea agglomerans LPS(LPSp)の内皮投与と lipid A誘導体 ONO-4007 の経口投与による IgE 依存型アレルギー反応の抑制効果, Biotherapy (Tokyo) (1997), Vol. 11, No. 3, p. 464-466
- 文献4 : 西沢孝志, 桧原一郎, 他, 小麦より分離した Pantoea agglomerans の精製 Lipopolysaccharide の生物活性についての検討, Biotherapy (Tokyo) (1992), Vol. 6, No. 3, p. 356-357
- 文献5 : 稲川裕之, 桧原一郎, 他, 小麦及び諸種グラム陰性菌由来リポ多糖の経口投与によるマウスを用いた鎮痛効果の比較検討, Biotherapy (Tokyo) (1992), Vol. 6, No. 3, p. 358-359
- 文献6 : Gen-Ichiro SOMA, Dynamic aspects of cytokine network to induce antitumor effects by intradermal administration of low molecular weight lipopolysaccharide derived from Pantoea Agglomerans., 薬学研究の進歩 (2000), Vol. 16, p. 7-22

【請求の範囲 1-6, 8, 9, 18, 19, 25】

請求の範囲 1-6, 8, 9, 18, 19, 25 に係る発明は、文献1より、新規性を有さない。文献1には、小麦粉に蒸留水を加えた小麦粉液を37°Cの水浴中で振とう培養し、培養経過時間0時、1時、2時、3時、4時、6時、8時、10時、12時、20時、24時、45時に各0.5mlを採取し、10°～10⁵倍希釈して標準寒天培地に100μl宛をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った ([0022]) ところ、8時間目、10時間目に認められたコロニーから、パントエア属、セラチア属、エンテロバクター属に属する細菌を得たことが記載されている。

第VII欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1 – 2 9 には、「食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材」を「専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌」によって発酵させて、同時に「該通性嫌気性グラム陰性菌を培養する発酵及び培養方法」に係る発明が記載されているが、明細書中において具体的に上記発酵及び培養を行ったのは、「0.5%小麦粉を炭素源として含むM9 寒天培地で37℃で6日間培養したあとコロニーの出現を観察したこと」、「小麦粉に蒸留水を加え懸濁し、上澄みをLプロス寒天培地に添加し37℃で一晩培養したこと」、「小麦粉に精製水を加え、オートクレーブした後、 α -アミラーゼを加え、65℃の水浴で4~12時間加熱した（小麦アミラーゼ処理液）溶液と、無機塩混合溶液、塩化マグネシウム溶液、塩化カルシウム溶液を表1の配合で含む小麦粉培地で醗酵したこと」、「おからにリン酸第一カリウム、リン酸第二ナトリウム、食塩、塩化カリウムを添加したおから培地でパントエア・アグロメランスで発酵したもの」、「米粉にリン酸第一カリウム、リン酸第二ナトリウム、食塩、塩化カリウムを添加した米粉培地をパントエア・アグロメランスで発酵したもの」、「乾燥わかめめかぶにリン酸第一カリウム、リン酸第二ナトリウム、食塩、塩化カリウムを添加したわかめめかぶ培地でパントエア・アグロメランスで発酵したもの」のみである。

「食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材」、「植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌」という記載は、多数の素材や菌を含有するものであることから、明細書の上記記載から、上記請求の範囲に係る発明のすべての「食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材」、「植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌」に対して免疫賦活効果、保湿効果、アレルギー作用低減効果等を有する培養物を得ることについては、明細書による十分な裏付けを欠いている。

補充欄

いざれかの欄の大きさが足りない場合

第 V. 欄の続き

出願人は答弁書において、常識的には、小麦粉に水を加えた小麦粉液には何の発酵現象も起きないことは明らかであると主張しているが、引用文献1に記載の「振とう培養」するという記載が発酵ではないとしても、小麦粉液を振とう（培養）したものを希釀して（しかも $10^0 \sim 10^5$ 倍希釀とは、希釀しないものも含む）培地に添加した際にコロニーが発生したことが引用文献1に記載されていることから、含量としては多いものではないが、標準寒天培地に小麦粉を含有させた培地でパントエア属等の微生物を培養することが記載されていると認められる。

請求項1には「食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材を 専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させる発酵、培養方法」に係る発明が記載されており、小麦粉のような「食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材」以外の成分を有する培地で培養することも含まれることから、本願上記請求項に係る発明と引用文献1に記載される発明は区別ができない。

【請求の範囲 7、24】

請求の範囲7、24に係る発明は、文献1より進歩性を有さない。

パントエア属に属する微生物として、本願優先日以前より、小麦から単離されたパントエア・アグロメランスが周知であったことから（要すれば、文献2-6）パントエア属としてパントエア・アグロメランスも培養することは適宜なし得ることである。

【請求の範囲 10-17、20-23、26-29】

請求の範囲10-17に係る発明の、「海草に由来する素材の発酵及び培養方法」、「小麦粉や、おから、海藻をパントエア・アグロメランスにより培養した、植物発酵エキス」は、文献1-6に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより容易に発明できたものでもない。

非特許文献13:Kearns, L. P. 外1名, "Appl Environ Microbiol." 1998年, 第64巻, 5号, p1837-1844

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0012] 既述したように、免疫賦活物質は植物自身が含有する場合と植物に共生する微生物の構成成分又は生産物である場合が多い。従って、摂取しても安全な天然物由来の免疫賦活物質を得ようとすれば、食用植物自身から成分を抽出するか（例えばリムラス陽性糖脂質、特許文献1）食用植物に共生する微生物を効率よく培養してその構成成分又は生産物を取得すること（例えば低分子量リポ多糖、特許文献2）が有用である。しかし、食用植物に含まれる免疫賦活物質の含量は少なく、食により免疫賦活効果を期待するためには極めて多量の食品を取らなければならず、また免疫賦活物質の摂取量を適正に保つことが一般的には容易でないために、効果が期待できない。さらに植物から抽出して食品や薬剤として利用する場合にも多額のコストがかかり実用性に乏しい。

[0013] 一方植物に共生する微生物に注目すると例えば、小麦共生細菌であるパントエア・アグロメランスは免疫賦活に有効な低分子量リポ多糖を構成成分として含んでいる。しかしこれまで低分子量リポ多糖を抽出するには、培養液に含まれるタンパク質の主成分が動物由来のもの、例えばNZアミンやトリプトンやカザミノ酸など高価な培養液を用いてパントエア・アグロメランスを培養する必要があった。従って、汎用性の高い免疫賦活物質として、安価に供給することが困難である、と同時にBSE他動物由来の未知の有害物質が混在していく可能性を否定できなかった。

[0014] 上記問題点に鑑み、本発明は、安全な素材を用いて安価に効率よく免疫賦活物質を得ることができる発酵及び培養方法、該方法によって得られる植物発酵エキス、該植物発酵エキスから得られる植物発酵エキス末並びに該植物発酵エキス末が配合されている植物発酵エキス配合物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明の発酵及び培養方法は、食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材を専ら植物に共生する

[0030] ポリミキシンB存在下でもマクロファージ活性化能を示す。また前記植物発酵エキスは免疫賦活効果を持つ。

前記通性嫌気性グラム陰性菌がパントエア属に属する桿菌であり、前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることが望ましい。

前記通性嫌気性グラム陰性菌がパントエア・アグロメランスであり、前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることが望ましい。

前記穀物に由来する素材が小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることが望ましい。

前記海草に由来する素材がわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることが望ましい。

発明の効果

[0031] 本発明によれば、動物由来の成分を含まない培地で培養することができる、動物成分由来の不純物の混入の問題がないので、例えばBSEや未知の有害物質混入の懼れがなく、安全性が高く、安価に多方面の用途に対応することができる植物発酵エキスの製造方法が提供され、安全、安価に免疫賦活物質含有植物発酵エキス又は植物発酵エキス末が製造でき、さらに該培養液、免疫賦活物質及びエキス及びエキス末さらに該エキス又はエキス末を配合した医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飼料及び浴用剤などを提供することができる。

[0032] 食用植物に由来する素材を専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させて、同時に該通性嫌気性グラム陰性菌を培養するという単純な過程で発酵及び培養ができるることは、これまで着想もされておらず、これまでの発酵技術の知見から容易に推察される事実ではない。

[0033] また、ある物質が免疫賦活効果を示す指標としてマクロファージからTNFが産生されるか否か（TNF誘導活性）を用いることができる。さらにTNF産生量によって免疫賦活効果を定量化することができる。そこで、小麦粉由来のリムラス陽性植物糖脂質、パントエア・アグロメランス由来の低分子量リポ多糖を用いてマクロファージからのTNF産生を検討すると、小麦粉由来のリムラス陽性植物糖脂質、パントエア・アグロメランス由来の低分子量リポ多糖ではいずれもポリミキシンB処理により、マクロファージからTNFが産生されなくな

9/1

るが、本発明の植物発酵エキスでは同上の処理を行ってもマクロファージからTNFが産生されることを多くの実施例において示した。このことは発酵培養を行った結果得られる本発明の植物発酵エキスが、その素材となった植物自身、及び、発酵に用いた微生物自身の構成成分それぞれによる免疫賦活効果とは質的に異なる免疫賦活効果を有することを示す。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]図1は、小麦発酵エキス入り飼料によるコイヘルペス発症抑制効果を示す図で

請求の範囲

- [1] (補正後) 食用植物に由来し主成分が多糖である糖質を含む素材を専ら植物に共生する通性嫌気性グラム陰性菌によって発酵させて、同時に該通性嫌気性グラム陰性菌を培養することを特徴とする発酵及び培養方法。
- [2] 前記素材は、専ら食用に供されるものであることを特徴とする請求項1記載の発酵及び培養方法。
- [3] 炭素源として澱粉を発酵させることを特徴とする請求項1又は2記載の発酵及び培養方法。
- [4] 前記通性嫌気性グラム陰性菌が桿菌であることを特徴とする請求項1乃至3いずれかに記載の発酵及び培養方法。
- [5] 前記通性嫌気性桿菌が腸内細菌科に属するものであることを特徴とする請求項4記載の発酵及び培養方法。
- [6] 前記通性嫌気性桿菌がパントエア属、セラチア属、又はエンテロバクター属に属するものであることを特徴とする請求項4記載の発酵及び培養方法。
- [7] 前記通性嫌気性桿菌がパントエア・アグロメランスであることを特徴とする請求項4記載の発酵及び培養方法。
- [8] 前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることを特徴とする請求項1乃至7いずれかに記載の発酵及び培養方法。
- [9] 前記穀物に由来する素材が小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることを特徴とする請求項8記載の発酵及び培養方法。
- [10] 前記海草に由来する素材がわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることを特徴とする請求項8記載の発酵及び培養方法。
- [11] 前記豆類に由来する素材がおからであることを特徴とする請求項8記載の発酵及び培養方法。
- [12] 請求項1乃至11いずれかに記載の発酵及び培養方法で得られることを特徴とする植物発酵エキス。
- [13] 請求項12記載の植物発酵エキスから得られることを特徴とする植物発酵エキス末。
- [14] 請求項12記載の植物発酵エキス又は請求項13記載の植物発酵エキス末が配合

されていることを特徴とする植物発酵エキス配合物。

[15] 前記植物発酵エキス配合物が医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飼料、又は浴用剤であることを特徴とする請求項14記載の植物発酵エキス配合物。

[16] 以下の理化学的性質を示すことを特徴とする請求項12記載の植物発酵エキス。

ポリミキシンB存在下でもマクロファージ活性化能を示す。

[17] 免疫賦活活性を持つことを特徴とする請求項12又は16記載の植物発酵エキス。

[18] (追加) 前記通性嫌気性グラム陰性菌がパントエア属に属する桿菌であり、前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることを特徴とする請求項1乃至3いずれかに記載の発酵及び培養方法。

[19] (追加) 前記穀物に由来する素材が小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることを特徴とする請求項18記載の発酵及び培養方法。

[20] (追加) 前記海草に由来する素材がわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることを特徴とする請求項18記載の発酵及び培養方法。

[21] (追加) 請求項18乃至20いずれかに記載の発酵及び培養方法で得られることを特徴とする植物発酵エキス。

[22] (追加) 請求項21記載の植物発酵エキスから得られることを特徴とする植物発酵エキス末。

[23] (追加) 請求項21記載の植物発酵エキス又は請求項22記載の植物発酵エキス末が配合されていることを特徴とする植物発酵エキス配合物。

[24] (追加) 前記通性嫌気性グラム陰性菌がパントエア・アグロメランスであり、前記食用植物が穀物、海草、若しくは豆類、又はこれらの混合物であることを特徴とする請求項1乃至3いずれかに記載の発酵及び培養方法。

[25] (追加) 前記穀物に由来する素材が小麦粉、米粉、小麦ふすま粉、米ぬか、又は酒かすであることを特徴とする請求項24記載の発酵及び培養方法。

[26] (追加) 前記海草に由来する素材がわかめ粉、めかぶ粉、又は昆布粉であることを特徴とする請求項24記載の発酵及び培養方法。

[27] (追加) 請求項24乃至26いずれかに記載の発酵及び培養方法で得られることを特徴とする植物発酵エキス。

[28] (追加) 請求項27記載の植物発酵エキスから得られることを特徴とする植物発酵エキス末。

[29] (追加) 請求項27記載の植物発酵エキス又は請求項28記載の植物発酵エキス末が配合されていることを特徴とする植物発酵エキス配合物。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.